

10/537378

PCT/CN03/00329

证 明

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 12 03

申 请 号： 02 1 53665.1

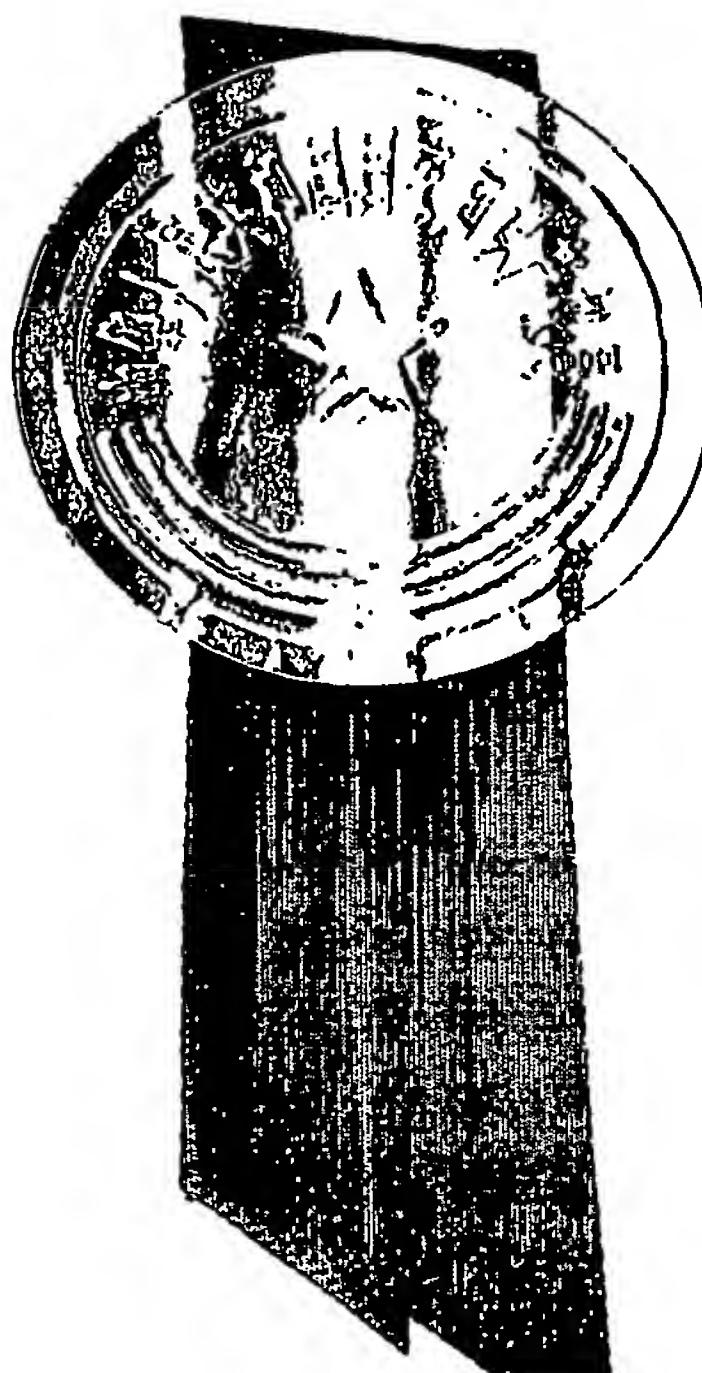
REC'D 26 JUN 2003
WIPO PCT

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 亲和反应的化学放大电化学检测方法及其试剂盒

申 请 人： 北京博奥生物芯片有限责任公司； 清华大学

发明人或设计人： 郭良宏； 李元光； 王娜； 王福泉； 杨夕强； 程京



PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 5 月 26 日

权 利 要 求 书

- 1、化学放大电化学检测方法，包括以下步骤：
 - 1) 提供能在氧化电极上与被分析的目的分析物结合和/或反应的反应物；
 - 2) 将可能含有目的分析物的样品与步骤 1) 中所提供的所述反应物接触
 - 3) 将可能含有目的分析物的样品与步骤 1) 中所提供的所述反应物接触。在合适条件下，所述分析物与所述反应物结合。所述反应物、分析物或者额外反应物或额外分析物或分析物类似物与处于还原态的电化学活性标记分子共价键连接。标记分子在电极上被氧化；
 - 4) 用不能在电极上发生电化学反应的还原剂将所述亲和物的电化学活性分子还原到还原态；
 - 5) 所述被还原的电化学活性分子重复参与步骤 3) 和 4) 的所述氧化-还原反应，产生放大的电化学信号；
 - 6) 评价放大的电化学信号，确定目的分析物在样品中的存在和/或目的分析物的量。
- 2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 3) 中所述电化学活性分子是在电极上被氧化；在夹心法中，反应物、分析物及电化学活性分子标记的额外反应物形成三元亲和物，使得电化学活性分子与电极密切靠近；在竞争法中，反应物与电化学活性分子标记的分析物形成二元亲和物，使得电化学活性分子与电极密切靠近；在直接检测中，反应物和被电化学活性分子标记的分析物形成二元亲和物，使得电化学活性分子与电极密切靠近。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述分析物选自细胞、细胞器、病毒、分子及其集合物或复合物。
- 4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述细胞选自动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞或培养细胞；所述细胞器选自细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、内质网、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体；所述分子选自无机分子、有机分子及其复合物。
- 5、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于：所述有机分子选自氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、碳水化合物、脂类及其复合物。
- 6、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述分析物选自激素、癌标记物、类固醇、固醇、药物化合物、药物化合物的代谢物及其复合物。
- 7、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述样品是哺乳动物样品、体液样品或临床样品。
- 8、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述哺乳动物选自牛科动物、

山羊、绵羊、马科动物、野兔、豚鼠、鼠科动物、人类、猫科动物、猴子、狗或猪；所述临床样品是血清、血浆、全血、痰、脑脊液、羊水、尿、胃肠内容物、头发、唾液、汗、齿龈刮取物、活体解剖组织。

9、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述反应物是抗体或核酸。

10、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述反应物选自细胞、细胞器、病毒、分子及其集合物或复合物；所述细胞选自动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞或培养细胞；所述细胞器选自细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、内质网、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体；所述分子选自无机分子、有机分子及其复合物；所述有机分子选自氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、碳水化合物、脂类及其复合物；所述分析物选自激素、癌标记物、类固醇、固醇、药物化合物、药物化合物的代谢物及其复合物。

11、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述电化学活性分子是过渡金属络合物。

12、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于：所述过渡金属选自钴、镍、锇、铁、铼、铬和钌；所述过渡金属络合物选自二茂铁、金属卟啉、金属聚吡啶、金属聚菲咯啉和金属酞氰染料。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于：所述过渡金属是三(2,2'-联吡啶)络合物或其衍生物之一。

14、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于：所述过渡金属是三(2,2'-联吡啶)合钌或其衍生物之一。

15、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述氧化电极是天然的或在现场形成的。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述氧化电极是金、铂、银、钴、镍、碳或金属氧化物电极。

17、根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于：所述金属氧化物电极是一种金属氧化物或联合了两种或多种金属氧化物的电极。

18、根据权利要求 17 所述的方法，其特征在于：所述金属氧化物选自氧化铟、氧化锡、氧化钛、氧化锆、氧化钨、氧化锌和氧化铁。

19、根据权利要求 18 所述的方法，其特征在于：所述金属氧化物是纯金属氧化物或掺杂金属氧化物；所述掺杂金属氧化物是掺锡的氧化铟或掺氟的氧化锡。

20、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述还原剂可以溶解在水溶液中。

21、根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于：所述有机氧化还原分子选自有有机酸、有机碱、有机离子和有机两性离子。

22、根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于：所述有机酸是羧酸或草酸；所述有机碱是胺、伯胺、仲胺、叔胺或三丙胺。

23、根据权利要求 21 所述的方法，其特征在于：所述有机氧化还原分子是离子化有机酸或离子化有机碱；所述离子化的有机酸是草酸盐；所述离子化的有机碱是质子化三丙胺。

24、根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于：所述有机两性离子为有机碱和有机酸。

25、根据权利要求 24 所述的方法，其特征在于：所述有机碱是胺，有机酸是羧酸。

26、根据权利要求 24 所述的方法，其特征在于：所述有机碱是胺，有机酸是磺酸。

27、根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于：所述有机两性离子是氨基酸，其中优选的是脯氨酸。

28、根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于：所述有机两性离子是“Good”缓冲液，其中优选的是 BES、BICINE、CAP、HEPPS、HEPES、MES、MOPS、PIPES、TAPS、TES 和 TRICINE。

29、权利要求 1—28 中任何一项所述的方法在酶联免疫吸附分析法 (ELISA)、免疫印迹、免疫沉淀反应、放射性免疫测定 (RIA)、免疫染色、乳胶凝集素、间接红血球凝聚 (IHA)、补体结合、间接荧光免疫分析 (IFA)、用悬液计测量悬液法、流体细胞分析、化学发光分析、横向流体免疫测定分析、 μ -捕获分析、抑制分析、能量转移分析、亲和力分析、浊度免疫分析或时间分辨放大穴状化合物发射 (TRACE) 分析中的应用。

30、一种进行化学放大电化学检测的试剂盒，它包括：

- 1) 能在氧化电极上与被分析的分析物结合和/或反应的反应物；
- 2) 一种与还原态电化学活性分子共价连接的额外的反应物、分析物或分析物类似物；
- 3) 不能被所述电极直接氧化的一种还原剂；
- 4) 评价放大的电化学信号以确定分析物在样品中的存在和/或量的装置。

31、根据权利要求 30 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括能氧化电化学活性分子，但不能氧化还原剂的氧化物电极。

说 明 书

亲和反应的化学放大电化学检测方法及其试剂盒

技术领域

本发明涉及电化学领域中一种检测分析物的方法和试剂盒，特别是涉及亲和反应的化学放大电化学检测方法及其试剂盒。

背景技术

长时间以来，为了使分析的灵敏度更高、成本更低和再现性更好，人们一直在努力改进已有的分析方法，并致力于新分析方法的开发。一般，对于基于亲和力的生物检测，是将标记物（信号产生分子）附着在生物分子上，该生物分子通过独特的生物识别过程结合到其互补物质上。识别反应类型包括 DNA-DNA、DNA-RNA、抗原-抗体、配体-受体等。通过测量以光、电、质量、声音等形式从标记物上发出的信号来检测结合反应，有时也可以对其进行定量检测。

在早期生物检测中，放射性同位素被用作标记物。它们提供了足够的灵敏度，但保存时间太短，而且对人类健康有害。随后它们被酶标记物和基于吸附的检测方法（如 ELISA）所取代。酶标记物安全，但长期保存不稳定，且灵敏度也有限。接着出现的是有机和无机荧光分子，它们都安全又稳定。尽管它们提供了比 ELISA 更高的灵敏度，但它们仍然不能与放射性同位素相媲美。由于复杂且昂贵的激光激发源和光学检测器件，设备成本也是一个主要劣势。最近，化学发光和电化学发光正在成为临床诊断实验室中所选择的检测方法，这要归因于它们的超高灵敏度（由于背景非常低）和稳定的反应物。然而，由于该方法仍然使用了光学检测，所以设备成本仍然相对较高。

与光学检测并行，在这条研究道路上，电化学也被用于化学和生物分析。由于其设备成本低且简单，电化学检测在成本和可携带性等主要问题方面已经相当成功。实例包括离子选择电极、手持葡萄糖测量仪和其它血液分析仪器。然而，亲和反应的电化学检测却没有如此成功，如抗体和抗原之间的检测。这主要是由于在常规电化学检测中存在这样一个事实，即用于亲和反应的标记物仅供出或接受一个作为被检测信号的电子。这一事实以及来自双电层的背景电流严重限制了其灵敏度。

将化学放大作为增强电化学信号的方法以前已被提出。为了实施该策略，将一种化学试剂加入电解液，被检测信号仍然是亲和反应标记分子的电化学电流。在反应程序中，首先是标记物被电极氧化。接着是氧化标记物和化学试剂之间在溶液中的氧化还原化学反应，该反应将标记物还原到其最初的氧化还原态。再生标记物可以再次参

与第一个步骤。总效应是同一标记分子的循环使用和电化学反应的重复进行。由于从同一标记物中提取了不止一个电子，这导致了信号放大。其过程为：

- (1) 电极反应：标记物（还原态） \rightarrow 标记物（氧化态）
- (2) 化学再生：标记物（氧化态）+还原剂 \rightarrow 标记物（还原态）
- (3) 重复(1)

尽管化学放大是在数年前就提出的，但还没有取得很大的成功。总的来说，主要原因是，用于放大的化学试剂可以在电极直接氧化，从而产生高背景电流。因此需要使放大效应最大化，同时使来自化学试剂的背景最小化。

典型地，亲和反应是在叫做标记物的产生信号的分子的帮助下被检测的，其中标记物是与亲和对之一结合的。正如上边所描述的，产生颜色、荧光、化学发光和电化学发光的多种分子已经被用作标记物。

理论上来说，由于许多生物分子的一些成分具有氧化还原活性，所以它们可以在不使用标记物的情况下直接用电化学方法来检测。例如，在 DNA 中，对标准氢电极而言，鸟嘌呤的氧化还原电势是 1.3V，该电势可以容易地在许多电极上测出。其它碱基具有更高的氧化还原电势。DNA 的糖结构也是可氧化的。在蛋白质中，酪氨酸的氧化还原电势是 0.82–0.95V，色氨酸是 0.82–1.07V，组氨酸是 1.32–1.62V。然而，这些氧化反应过程很慢，以致于它们对于检测没有实用价值。

在美国专利 5,871,918 中，Thorp 等人描述了一个用鸟嘌呤碱基的间接电化学氧化来分析 DNA 的方法。在该方法中，靶 DNA 与固定在电极表面的探针杂交。将过渡金属络合物如三联吡啶合钌溶解在溶液中，并用来促进靶 DNA 中的鸟嘌呤碱基的电化学氧化。络合物首先被电化学氧化，然后通过与鸟嘌呤的化学反应被还原。被还原的络合物可以再次在电极上被氧化。该方法的缺点是：络合物在不存在任何 DNA 的情况下也会产生氧化电流，从而产生背景信号。另外，由于 DNA 中鸟嘌呤碱基的数量很少，所以放大效果不高。在美国专利 6,346,387 中，Thorp 等人又提出了一个类似的方法。

正如上边所提到的，电化学标记物可以被用来分析亲和反应。在美国专利 5,312,527 中，Mikkelsen 等人用三联吡啶合钴通过非共价结合来标记 DNA 双链结构，随后进行电化学检测。DNA 双链结构被杂交在玻碳电极上。将少量的钴络合物加入电解液。它通过插入结合到双链结构上，但不结合到单链上。在不存在靶 DNA 的情况下，该络合物在低浓度下均匀地分布在溶液中，从而产生一些背景电流。当靶 DNA 被引入而且与固定在电极上的探针杂交时，络合物就会插入双链结构。络合物在电极表面的积聚所产生的电流远远高于溶液中的络合物所产生的电流。这就可以作为双链结构形

成的标志。该方法与 Thorp 的方法有相同的缺点，即未结合的金属络合物会产生高背景电流。

按照标记 DNA 的传统方法，Meade 等人在美国专利 6,277,576 中公开了一个将电化学标记物共价结合到 DNA 的糖结构上的合成方法。二茂铁，一种典型的具有快速电极动力学的电化学化合物，被用作标记物。DNA 探针通过导电硫醇分子被固定在金电极上。用绝缘层覆盖电极表面的其它区域。在标记的 DNA 与探针杂交之后，检测二茂铁的电化学电流，同时绝缘层将背景电流保持在最小。但是该公开的方法中没有放大机制。

酶在许多场合已经被用作 DNA 和免疫反应的标记物。由于一个酶分子能催化数千个或更多个底物分子，所以存在一个内在的放大机制。实例包括那些在 William Heineman, et al. *Anal. Chem.* 1996, 68, 2453; I. Willner et al. *Anal. Chem.* 1996, 68, 3151; Adam Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 769 中所公开的内容。但酶分子的大尺寸和不稳定性已经限制了它们的应用。

美国专利 6,221,586 使用了一个用具有电化学活性的 DNA 插入物作为标记物的方法，并且公开了以溶解的铁氰化物作为被氧化的插入物的还原剂。由于很难抑制所使用的铁氰化物在金电极上的直接氧化电流，所以高背景是一个主要问题。

发明内容

本发明的目的是提供一种有效、灵敏的化学放大电化学检测方法。

化学放大电化学检测方法，包括以下步骤：

- 1) 提供能在氧化电极上与被分析的目的分析物结合和/或反应的反应物。
- 2) 将可能含有目的分析物的样品与步骤 1) 中所提供的所述反应物接触。在合适条件下，所述分析物与所述反应物结合。所述反应物、分析物或者额外反应物或额外分析物或分析物类似物与处于还原态的电化学活性标记分子以共价键连接。标记分子在电极上被氧化。
- 3) 用不能在电极上发生电化学反应的还原剂将所述亲和物的电化学活性分子还原到还原态；
- 4) 所述被还原的电化学活性分子重复参与步骤 2) 和 3) 的所述氧化-还原反应，产生放大的电化学信号；
- 5) 评价放大的电化学信号，确定目的分析物在样品中的存在和/或目的分析物的量。

所述“电化学活性分子”指当给电极施加适当的电压时，可以给电极输送电子或接受来自电极的电子的分子。

步骤 2) 中，将可能含有目的分析物的样品与步骤 1) 中所提供的所述反应物接触，使得如果样品中存在分析物，允许其与反应物结合，其中反应物、分析物或者额外反应物或额外分析物或分析物类似物以共价键连接到还原态电化学活性分子上，并且使电化学活性分子与电极密切靠近，以使电化学活性分子被电极氧化。

所述步骤 2) 中所述电化学活性分子是在电极上被氧化；在夹心法中，反应物、分析物及电化学活性分子标记的额外反应物形成三元亲和物，使得电化学活性分子与电极密切靠近；在竞争法中，反应物与电化学活性分子标记的分析物形成二元亲和物，使得电化学活性分子与电极密切靠近；在直接检测中，反应物和被电化学活性分子标记的分析物形成二元亲和物，使得电化学活性分子与电极密切靠近。

所述分析物可以选自细胞、细胞器、病毒、分子及其集合物或复合物。所述细胞选自动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞或培养细胞；所述细胞器选自细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、内质网、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体所述分子选自无机分子、有机分子及其复合物。所述有机分子选自氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、碳水化合物、脂类及其复合物。

所述分析物还可以选自激素、癌标记物、类固醇、固醇、药物化合物、药物化合物的代谢物及其复合物。

所述样品可以是哺乳动物样品、体液样品或临床样品。所述哺乳动物选自牛科动物、山羊、绵羊、马科动物、野兔、豚鼠、鼠科动物、人类、猫科动物、猴子、狗或猪；所述临床样品是血清、血浆、全血、痰、脑脊液、羊水、尿、胃肠内容物、头发、唾液、汗、齿龈刮取物、活体解剖组织。

所述反应物是抗体或核酸。所述反应物可以选自细胞、细胞器、病毒、分子及其集合物或复合物；所述细胞选自动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞或培养细胞；所述细胞器选自细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、内质网、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体所述分子选自无机分子、有机分子及其复合物；所述有机分子选自氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、碳水化合物、脂类及其复合物；所述分析物选自激素、癌标记物、类固醇、固醇、药物化合物、药物化合物的代谢物及其复合物。“抗体”指免疫球蛋白的特定类型，即 IgA、IgD、IgE、IgG 如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4，以及 IgM。抗体可以以任何合适的形式存在，而且可以含有任何合适的片断或衍生物。代表性的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、Fab 片断、Fab' 片断、F(ab')2 片断、Fv 片断、微型双功能抗体、单链抗体和由抗体片断形成的多专一性抗体。“核酸”指

任何含有包括但不限于 DNA、RNA 或 PNA 分子的核酸。该术语包括序列，其中包括 DNA 和 RNA 的任何已知碱基类似物，包括但不限于 4-乙酰基胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、吖丙啶基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫脲嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、次黄嘌呤、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基次黄嘌呤、2,2'-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫胞嘧啶、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-硫代甲基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-含氧乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-含氧乙酸、假尿嘧啶、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-含氧乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-含氧乙酸、假尿嘧啶、2-硫胞嘧啶和 2,6-二氨基嘌呤。

所述电化学活性分子是过渡金属络合物。所述过渡金属选自钴、镍、锇、铁、铼、铬和钌；所述过渡金属络合物选自二茂铁、金属卟啉、金属聚吡啶、金属聚菲咯啉和金属酞氯染料。过渡金属可以是金属三(2,2'-联吡啶)或其衍生物之一，较优选的是钌三(2,2'-联吡啶)或其衍生物之一。一般来说，电化学标记物应具有下述特征：(1)它们可以与检测中所使用的电极发生快速的电化学反应；(2)分子的氧化态和还原态都是稳定的；(3)它们具有可以被用来连接其它分子的官能基团；(4)可以容易且便宜地合成和纯化；(5)当它们与其它分子连接时，亲和反应不会受到任何显著有害的影响。合适的标记物主要是过渡金属络合物，如二茂铁、金属卟啉、金属聚吡啶、金属聚菲咯啉和金属酞氯染料。金属聚吡啶是一种优选的电化学标记物。例如，相对于饱和的甘汞电极，金属(2,2'-联吡啶)的氧化还原电势的变化范围在 0 V 和 1.1 V 之间。

“电极”指导体或半导体电极，通过它们电流进入或离开介质。介质可以是电解液、固体、熔融体、气体或真空。“氧化物电极”指由金属氧化物或非金属氧化物组成的导体或半导体。

为了适合化学放大电化学检测，电极必须能与标记物发生快速的电子交换，但与还原剂的电化学反应小到可以忽略。有很多氧化电极可以满足该要求。根据电极如何被氧化，可以粗略地将其分成两组。第一组电极通常是原子态，但在电化学测量中可以很容易地被氧化。换句话说，可以在现场形成氧化电极。一旦电压被去除，氧化态就会不稳定。这些电极包括金、铂、银、钴、镍、碳等。第二组包括金属氧化物电极，它们是稳定的氧化物。这些物质包括氧化铟、氧化锡、氧化钛、氧化锆、氧化钨等。它们可以是纯金属氧化物，或掺杂金属氧化物，如掺锡的氧化铟(ITO)。其中优选

电极是金属氧化物，如掺杂了金属的或纯的氧化铟、氧化锡、氧化钛，最优先的是掺锡的氧化铟或掺氟的氧化锡。各种形状和大小的金属氧化物电极可以用公知方法制备。

还原剂必须具有氧化还原活性，并且其氧化还原电势低于标记分子的氧化还原势，以使它可以还原氧化的标记物。而且，它自己的电化学电流必须被保持在最小以获得最大的检测灵敏度。另外，优选地，试剂要具有在水溶液中的足够可溶性，且具有很长的保存时间。通常，有机氧化还原分子在许多氧化电极上表现出很慢的电化学反应。原因目前还不清楚，但一般的观点是电化学反应包括分子和金属表面之间的化学键合。在被氧化的表面，不能形成这样的键合，因此减缓了电子转移反应。代表性还原剂包括有机酸、有机碱、有机离子和有机两性离子。这些还原剂可以分成下述几种：饱和烷基、不饱和烷基、芳族或杂环化合物。它们可以含有-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-SH 等取代基。有机酸包括一元羧酸、二元羧酸和多元羧酸。优选的有机酸是二元羧酸。最优先的是草酸。有机碱包括单胺和多胺，胺可以是伯胺、仲胺或叔胺。优选的有机碱是叔胺。最优先的是三丙胺。而且，上述有机酸和有机碱的离子化形式也适合用于电化学信号的化学放大的还原剂。最优先的是草酸盐和质子化三丙胺。一些有机两性离子如氨基酸和生物缓冲分子既含有羧酸也含有胺。也已经发现它们是合适的还原剂。优选的有机两性离子包括脯氨酸、PIPES 和 HEPES。

所述还原剂应该是可以溶解在水溶液中的物质。有机氧化还原分子可以选自有机酸、有机碱、有机离子和有机两性离子。所述有机酸是羧酸或草酸；所述有机碱是胺、伯胺、仲胺、叔胺或三丙胺。有机氧化还原分子还可以选自离子化有机酸或离子化有机碱；离子化的有机酸优选的是草酸盐；离子化的有机碱优选的是质子化三丙胺。所述有机两性离子优选的有机碱和有机酸，其中较佳的配合是所述有机碱是胺，有机酸是羧酸或者有机碱是胺，有机酸是磺酸。所述有机两性离子还可以是氨基酸，其中优选的是脯氨酸。所述有机两性离子也可以是“Good”缓冲液，其中优选的是 BES、BICINE、CAPS、HEPPS、HEPES、MES、MOPS、PIPES、TAPS、TES 和 TRICINE。“Good”缓冲液指由 Good 等人于 1996 年 (Good, N. E. et al., Biochemistry, 5:467 (1966)) 提出的缓冲液种类。它们是含有作为带正电基团的仲胺和叔胺，以及含有作为带负电基团的磺酸和羧酸的两性离子缓冲液。代表性的“Good”缓冲液包括 N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES) (或 N,N-双(2-羟乙基)牛磺酸)、牛磺酸 N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸(BICINE)、3-(环己基氨基)-1-丙磺酸(CAPS)、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-丙磺酸(HEPPS) (或 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(3-丙磺酸))、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES) (或 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸))、2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES) 或其半

钠盐或其一水化合物、4-吗啉丙磺酸(MOPS) (或 3-吗啉丙磺酸)、哌嗪-1, 4-双(2-乙磺酸) (PIPES) (或 哌嗪-N, N' - 双(2-乙磺酸) 或 1, 4-哌嗪二乙磺酸)、[(2-羟基-1, 1-双[羟甲基]乙基)氨基]-1-丙磺酸(TAPS) (或 N-[三(羟甲基)甲基]-3-氨基丙磺酸)、2-[2-羟基-1, 1-双(羟甲基)乙氨基]乙磺酸(TES) (或不含 TES 的酸)，和 N-[2-羟基-1, 1-双(羟甲基)乙基]甘氨酸(TRICINE) (或 N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸) (通常参考 Sigma-Aldrich 产品目录)。

本发明的第二个目的是提供一种能够较灵敏地进行化学放大电化学检测的试剂盒。

为实现这一目的，本发明所提供的试剂盒包括：

- 1) 能在氧化电极上与被分析的分析物结合和/或反应的反应物；
- 2) 一种与还原态电化学活性分子共价连接的额外的反应物、分析物或分析物类似物；
- 3) 不能被所述电极直接氧化的一种还原剂；
- 4) 评价放大的电化学信号以确定分析物在样品中的存在和/或量的装置。

所述“还原剂不能被所述电极直接氧化”的意思是，尽管还原剂的标准电极电势和施加于电极上的电压之间的差别大到足以氧化还原剂，但氧化的速度非常低，以至于该反应可以被忽略。

为了使试剂盒更加完善，所述试剂盒还包括能氧化电化学活性分子，但不能氧化还原剂的氧化物电极，以及操作说明书。

利用本发明的方法检测分析物，与现有技术相比，具有灵敏度高，成本低的特点。其灵敏度相对于当前常用的荧光方法没有变化，但设备成本显著降低。本发明的方法在酶联免疫吸附分析法(ELISA)、免疫印迹、免疫沉淀反应、放射性免疫测定(RIA)、免疫染色、乳胶凝集素、间接红血球凝聚(IHA)、补体结合、间接荧光免疫分析(IF)、用悬液计测量悬液法、流体细胞分析、化学发光分析、横向流体免疫测定分析、 μ -捕获分析、抑制分析、能量转移分析、亲和力分析、浊度免疫分析或时间分辨放大穴状化合物发射(TRACE)分析中均将具有广泛的应用。

附图说明

图 1 为草酸钠放大的三(2, 2'-联吡啶)合钌的循环伏安图。

图 2 为草酸钠放大的三(2, 2'-联吡啶)金属的电化学电流与氧化还原电势的关系。

图 3 为脯氨酸与不同浓度的三(2, 2'-二吡啶)合钌的循环伏安图。

图 4 为脯氨酸放大电流与三(2, 2'-二吡啶)合钌浓度的线性关系曲线。

图 5 为不同浓度的钌(4, 4' -二羧基)-双(2, 2' -联吡啶)标记的亲和素与吸附在氧化铟锡电极上的生物素-BSA 作用后产生的化学放大电化学电流。

具体实施方式

实施例 1、本发明的方法用于夹心免疫测定

当用于夹心免疫测定时，其步骤如下：

- 1、将抗体/抗原亲和对(俘获抗体)之一固定在电极上；
- 2、测试样品接触电极，当存在抗原时，抗原与固定的俘获抗体结合；
- 3、用有共价结合电化学标记物的第二个抗体(标记抗体)接触电极，从而形成俘获抗体/抗原/标记抗体的三元复合物；
- 4、将电极浸入含有还原剂的溶液中。测量标记物的化学放大电化学电流，确定测试样品中抗原的存在和/或存在量。

上述方法也适用于其它基于亲和力的分析，如配体-受体、DNA-DNA、DNA-RNA、蛋白质-DNA 结合对。分析物可以是自然存在物或化学合成物、生物化学品或生物分子，包括药物、肽、蛋白质、配体、受体、糖、维生素、激素、脂类、寡核苷酸、DNA、RNA、病毒和细胞。

实施例 2、草酸盐放大的钌三联吡啶的电化学电流

三(2, 2' -联吡啶)合钌是从 Alfa Aesar 购买的，草酸钠是从 Avocado 购买的。制备含有 10mM 草酸钠、0.5mM 三-(联吡啶)合钌、0.1M 磷酸钠的溶液，pH 为 5.5。电化学测量是在 CHI 630A 电化学分析仪上完成的。工作电极是涂敷在 0.8cm² 载玻片上的氧化铟锡薄膜。铂箔被用作对电极，饱和甘汞作为参比电极。为了完成测量，电极电压以 100 mV/s 速率从 0 V 扫描到 1.3 V，然后回到 0 V。记录扫描过程的电流。将电流对电压作图，如图 1 所示。曲线 1 是含有三联吡啶合钌的溶液，曲线 2 是不含金属络合物的溶液。

实施例 3、草酸盐放大的各种金属络合物的电化学电流

单羧酸二茂铁是从 Alfa Aesar 购买的。锇和铁的三(2, 2' -联吡啶)络合物是根据文献合成的 (C. Creutz, et al., J. Am. Chem. Soc., 1980, 102, 1309)。制备含有 10mM 草酸钠、0.5mM 金属络合物、0.1M 磷酸钠的溶液，pH 为 5.5。按实施例 2 的描述进行电化学测量。结果如图 2 所示，金属络合物的放大电流是其标准电势的函数。从图中可以看出，具有最大氧化标准电势的三(2, 2' -联吡啶)合钌产生了最大的电流。

实施例 4、各种还原剂放大的三(2, 2' -联吡啶)合钌的电化学电流

还原剂选用哌嗪-1, 4-双(2-乙磺酸)(PIPES)(购自 ICN)、三丙胺(购自 Alfa Aesar)、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)(购自 Avocado)、脯氨酸(购自 Alfa Aesar)、三丁胺和三乙胺。

制备含有 10mM 溶解在 0.1M 磷酸钠中的还原剂的溶液。在还原剂的电化学测量得到背景电流后，加入三(2, 2' -联吡啶)合钉，使终浓度为 0.5mM。用与测量背景电流相同的方式测量放大电流。放大系数是先用各个电压下的放大电流除以背景电流，再选择最大值而获得的。各种还原剂的放大系数如表 1 所示，从表 1 的数据可以看出，草酸盐具有最大的放大系数。

表 1：各种还原剂的放大系数（除非另外说明，所用 pH 为 7.5）

还原剂	放大系数
草酸钠 (pH 5.5)	2800
甲酸	1
三乙胺	< 238
三丙胺	238
三丁胺	< 238
脯氨酸	580
HEPES (pH 8.5)	550
PIPES (pH 8.5)	175
鸟嘌呤核苷	<< 238

实施例 5、不同浓度三(2, 2' -联吡啶)合钉条件下脯氨酸的放大电流

制备含有 10mM 脯氨酸、0.1M 磷酸钠的溶液，pH 为 7.5。在还原剂的电化学测量得到背景电流后，加入三(2, 2' -联吡啶)合钉，使终浓度分别为 125uM、250uM、375uM 和 500uM。对每一种络合物浓度，测量脯氨酸放大的电流（结果如图 3 所示）。结果显示电流与钉浓度成线性关系（如图 4 所示）。

实施例 6、用本发明化学放大电化学方法检测生物素-亲和素的结合

在室温下，将氧化铟锡电极浸入 1mg/mL 生物素标记的牛血清蛋白（生物素-BSA）溶液中 1 小时，使生物素-BSA 被吸附到氧化铟锡电极上。用磷酸盐缓冲液冲洗后，在室温下将电极浸入用(4, 4' -二羧基)-双(2, 2' -联吡啶)合钉标记的亲和素溶液中 1 小时。用磷酸盐缓冲液再次冲洗电极。然后将其放入 pH 为 5.5，含有 10mM 溶解在 0.1M 磷酸中的草酸钠溶液的电化学池中。如实施例 2 所述测量电化学电流。结果如图 5 所示，表明电流是亲和素浓度的函数。

说 明 书 附 图

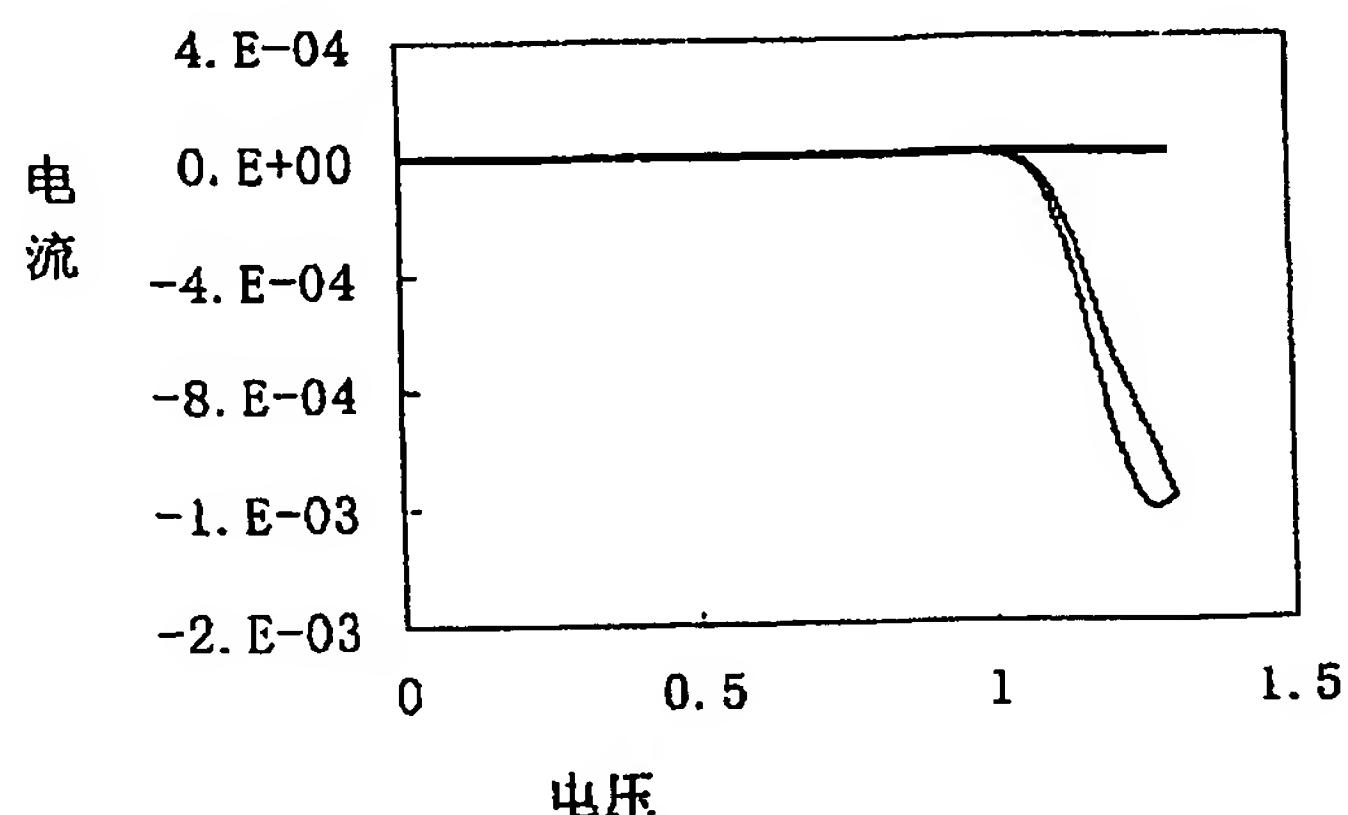


图 1

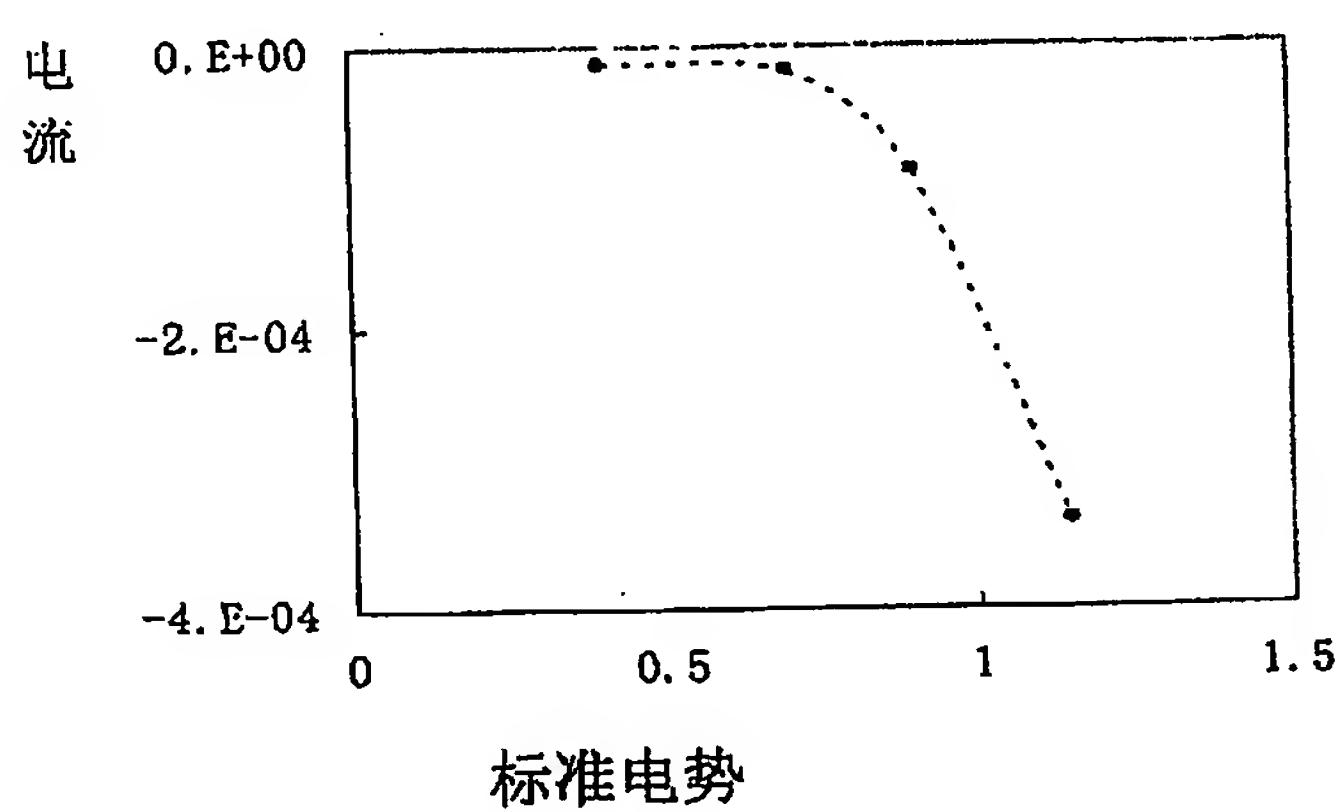


图 2

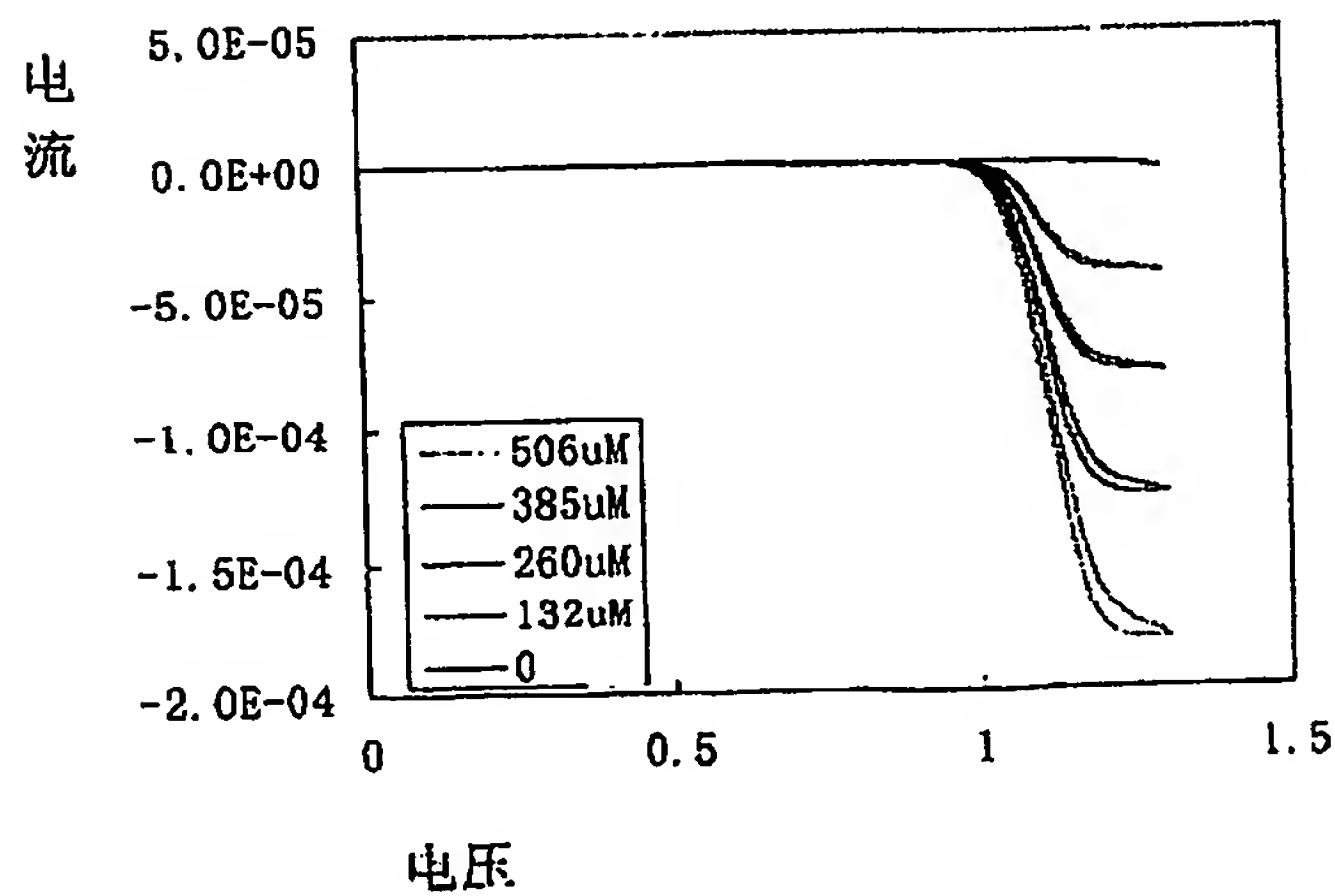


图 3

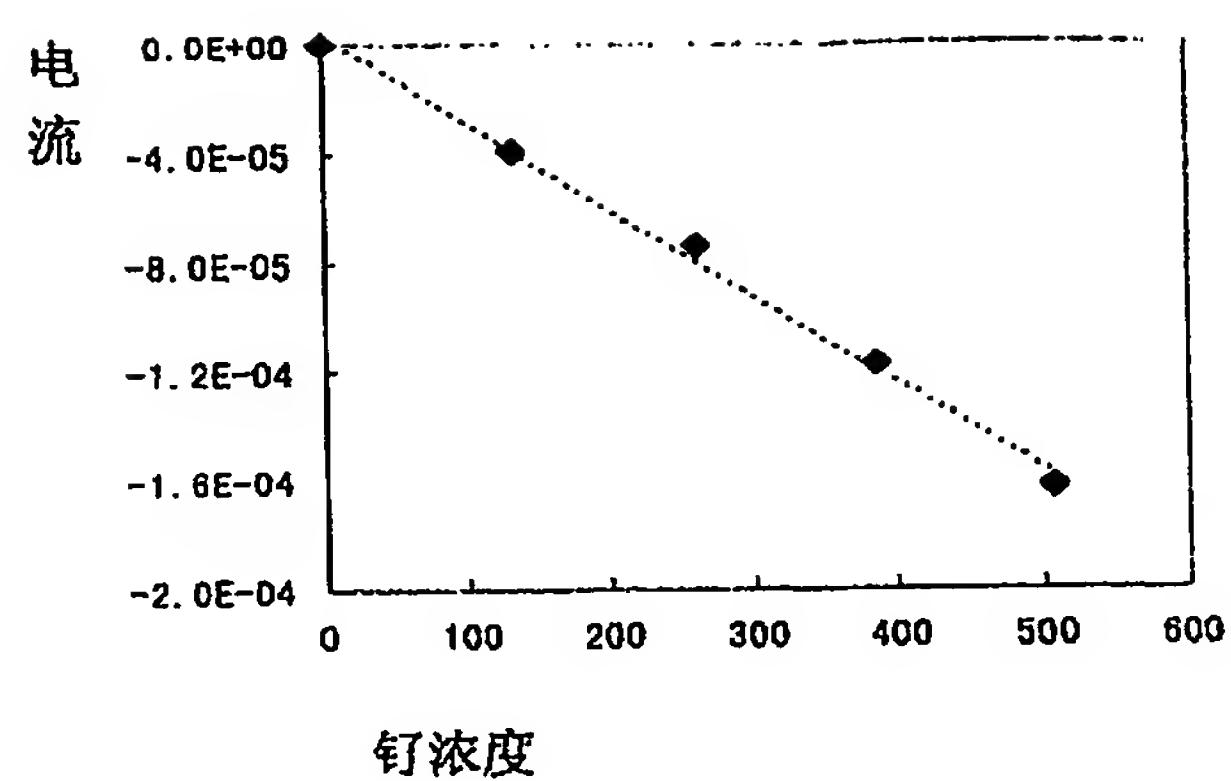


图 4

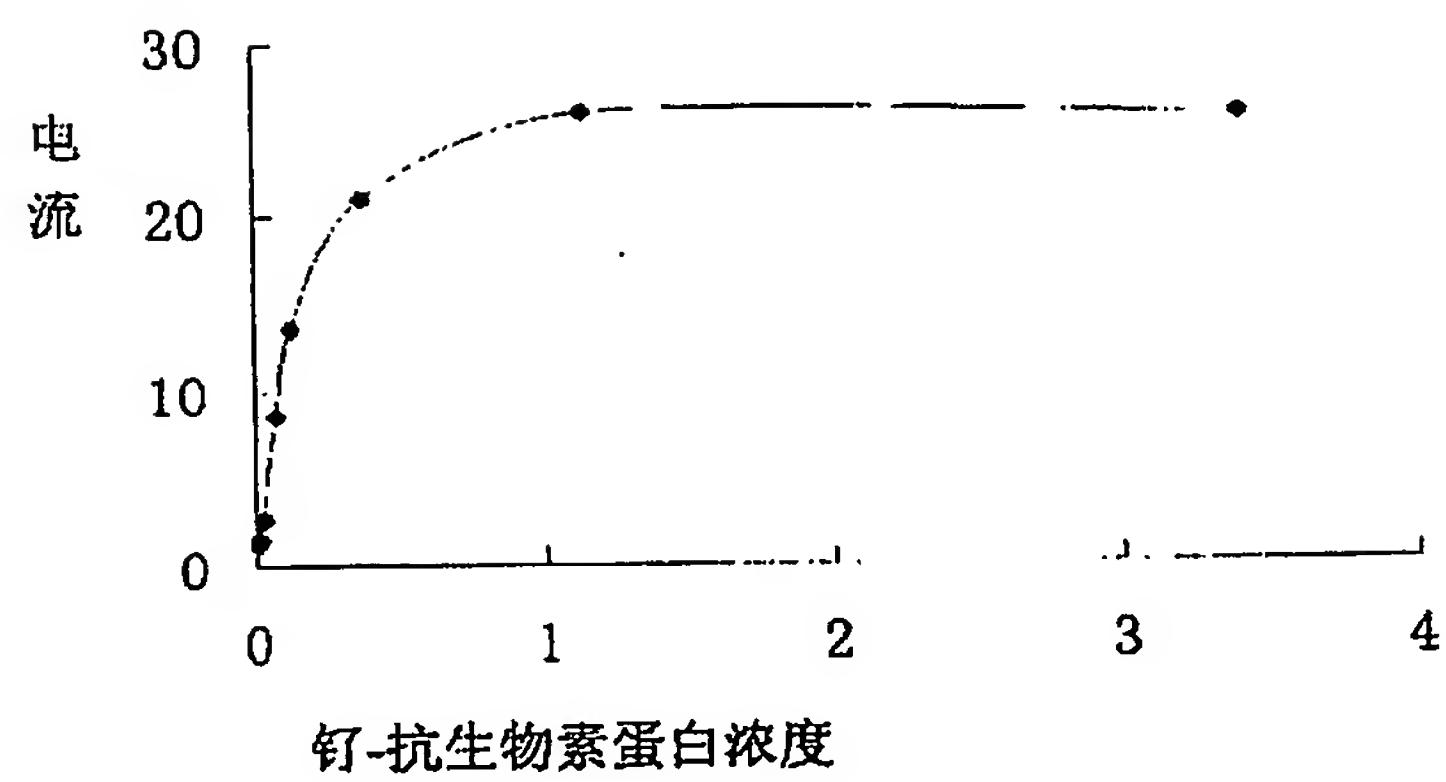


图 5